

UNTERSUCHUNGEN ZUR
PROSTAGLANDINSTIMULIERTEN ADH-FREISETZUNG
- in vitro- und in vivo-Experimente;
radioimmunologische Bestimmungsmethode -

Rosemarie Haslbeck

1978

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität
München

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROSTAGLANDINSTIMULIERTEN
ADH-FREISETZUNG

- in vitro- und in vivo-Experimente;
radioimmunologische Bestimmungsmethode -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rosemarie Haslbeck

aus
Vilshofen

1978

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung	S. 1 - 3
B. Allgemeines	
I. Prostaglandine	S. 4 - 6
II. ADH	S. 6 - 8
C. Methodik	
I. Analysen	
1. Probengewinnung	S. 9
2. Extraktion	S. 9 - 14
2.1. Vorversuche	
2.2. Ausführung	
3. Radioimmunoassay	S. 15 - 18
3.1. Prinzip	
3.2. Ausführung	
3.2.1. Eichkurve	
3.2.2. Plasmaproben	
II. Tierversuche	
1. In vitro Experimente	S. 19 - 20
2. In vivo Experimente	S. 21 - 22
D. Ergebnisse	
I. Wiederfindungsrate von ADH aus Plasmaproben	S. 23 - 24
II. In vitro Experimente	S. 25 - 31
1. Zeitserien	
2. Stimulation der ADH-Sekretion durch PG E ₂ bzw. PG A ₂	
3. Zugabe von Arachidonsäure C _{20:4}	

III. In vivo Experimente S. 32 - 34

F. Diskussion

I. Diskussion zur Methode S. 35 - 44

II. Diskussion der Tierversuche S. 44 - 47

F. Zusammenfassung S. 48 - 49

G. Literaturverzeichnis S. I - V

A. Einleitung

Die Beteiligung von Plasmaosmolalität und Plasmavolumen an der Regulation der ADH-Freisetzung aus der Hypophyse ist experimentell gut belegt und hinlänglich bekannt. Darüberhinaus wurden während der letzten Jahre Ergebnisse mitgeteilt (3, 4, 14, 20, 22, 23, 26), die nahelegen, daß noch weitere Faktoren hierbei von Bedeutung sein könnten.

Zur Diskussion steht ein Zusammenwirken bzw. eine gegenseitige Beeinflussung von Renin-Angiotensin-System und Prostaglandinen.

Ganten et al. (7, 8) fanden ein intracerebrales "intrinsic renin angiotensin system". Später zeigten Yang und Neff (28) die hohe Spezifität lokal verschiedener Konzentrationen an A I, A II und Converting Enzyme im ZNS. An isolierten Rattenhypophysen führte die Zugabe von A II zum Inkubationsmedium zu einem Anstieg der ADH-Sekretion auf das Doppelte des Kontrollwertes (6).

Bei Versuchen an Hunden konnte ein signifikanter Anstieg des ADH-Spiegels im Plasma sowohl nach Angiotensin-, als auch nach Renininfusionen gefunden werden (4, 14).

Diese Daten würden für eine Angiotensin II stimulierte ADH-Freisetzung sprechen, wobei die Rezeptoren dieses Systems möglicherweise in die Nuclei Paraventriculares zu lokalisieren wären.

weniger zahlreich und nicht immer übereinstimmend in

ihrer Aussage waren Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen Prostaglandinen und der ADH-Freisetzung. Gagnon et al. (6) zeigten, daß die Spontanfreisetzung von ADH aus isolierten Rattenneurohypophysen nach Zugabe von PGE_2 signifikant anstieg.

Vilhardt et al. (26) fanden nach Infusionen von PG E_2 in die Carotis von Ratten eine deutliche Verminderung der Urinmenge mit einem Anstieg der Urinosmolalität. Aus diesen Ergebnissen wurde auf eine stimulierte ADH-Freisetzung geschlossen, ohne daß allerdings der aktuelle Plasmaspiegel von ADH bestimmt worden ist.

Diese Ergebnisse - gesicherte Stimulation der ADH-Freisetzung durch Angiotensin und mögliche Stimulation durch Prostaglandine - ließen sich zu einer interessanten Hypothese zusammenfassen: Das die Wasserbalance regulierende ADH und das den Salzhaushalt beeinflussende Renin-Angiotensin-System sind nicht nur in der Niere, sondern auch im Zentralorgan miteinander verknüpft.

Diese Verbindung könnte durch Zwischenschaltung von Prostaglandinen zustande kommen.

In den vorgelegten Versuchen sollte die Wirkung der Prostaglandine auf die genannten Systeme genauer untersucht werden.

Zwei Versuchsmodelle boten sich an: Einmal (für die zahlreichen orientierenden Versuche) das Modell der inkubierten Rattenhypophyse, wobei die zu testenden Substanzen leicht appliziert werden können, zum anderen

(als Ergänzung), der in vivo-Versuch an Kaninchen, denen die Substanzen intraarteriell injiziert wurden. Entsprechend der erwähnten Hypothese würde also nach Gabe von Prostaglandinen in beiden Fällen eine signifikante Steigerung der ADH-Freisetzung erwartet werden. Es muß noch hinzugefügt werden, daß die besondere Schwierigkeit bei Experimenten dieser Art bisher die Unempfindlichkeit der biologischen ADH-Bestimmungsmethoden war. Dieses Problem konnte überwunden werden, nachdem eine radioimmunologische Bestimmungsmethode für ADH entwickelt worden war. Damit stand uns eine Methode mit großer Spezifität und Sensibilität zur Verfügung.

B. Allgemeines

I. Prostaglandine

Die Stoffgruppe der "Prostaglandine" ist seit 1930 bekannt. Eine Beobachtung von Kurzrok und Lieb führte zu ihrer Entdeckung: Samenflüssigkeit des Menschen verursachte eine Kontraktion oder Relaxation des Uterus. Einige Jahre später wurde durch Goldblatt und unabhängig von ihm durch von Euler die stark stimulierende Wirkung der Samenflüssigkeit des Menschen auf die glatte Muskulatur untersucht. Eine vergleichbare Wirkung zeigte auch das Samenbläschenextrakt vom Hammel; in weiteren Versuchen konnte daraus eine Verbindung isoliert werden, die sowohl Lipid- als auch Säurecharakter aufwies, Kontraktionen der glatten Muskulatur verursachte und nach Injektion einen Blutdruckabfall bewirkte. Dieser "aktive Faktor" wurde Prostaglandin genannt; man nahm an, daß es sich hierbei um ein Sekret der Prostata handelte. 1957 gelang im Karolinska Institut (Stockholm) die Isolierung von zwei kristallinen Verbindungen, sie wurden PG E₁ und PG F₂ genannt. 1962 konnten Bergström und Samuelsson die Struktur dieser beiden Substanzen aufklären. Danach sind Prostaglandine Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen; Grundgerüst ist die gesättigte alizyklische Prostansäure. Sie werden in vivo an der Zellmembran aus essentiellen

Fettsäuren synthetisiert.

Bis jetzt wurden 14 Substanzen als Prostaglandine bekannt.

In den wenigen Jahren seit Isolierung der ersten beiden Prostaglandine wurde ein breites Spektrum der physiologischen Wirksamkeit dieser hormonähnlichen Substanzen entdeckt.

Sie greifen unter anderem in die Tätigkeit der glatten Muskulatur ein, beeinflussen die Durchblutung der verschiedensten Organe und -systeme, wirken auf Sekretionsmechanismen endo- und exokriner Drüsen. Auf verschiedene Hormonsysteme wurde ein stimulierender Effekt wahrscheinlich gemacht (z.B. FSH, ACTH, GH, TSH).

Sie spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellstoffwechsels, es bestehen enge Verbindungen zum zyklischen AMP. Je nach ihrer Lokalisation im Gewebe vermögen die Prostaglandine die Synthese des cAMP entweder zu steigern oder zu vermindern, und wären somit eine Vermittlersubstanz zwischen Hormon und spezifischer Reaktion des Bestimmungsgewebes.

Wahrscheinlich sind Prostaglandine auch in die Kontrollsysteme zur Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes eingeschaltet.

Die periphere Wirkung von Prostaglandinen auf die Niere wurde bereits vielfältig untersucht (9, 11, 12, 24).

Danach gehören die Prostaglandine der PG E- und PG A-Serien zu den wirksamsten der natürlich natriuretisch

wirkenden Substanzen. Sie steigern die Urinbildung, vermehren die Na^+ - und K^+ - Ausscheidung beträchtlich, verhindern die Na^+ - Rückresorption und vermehren auf diese Weise osmotische- und freie-Wasser-Clearance. Möglicherweise wirkt bei der PG - beeinflussten Steigerung der Freiwasserclearance die Tatsache mit, daß ADH durch PG E_1 gehemmt wird. Eine Verminderung der ADH - induzierten Permeabilitätssteigerung durch PG E wurde an der Krötenblase wie am Sammelrohr vom Kaninchen (15, 16) gezeigt. Die periphere Wirkung der Prostaglandine auf den Salz- und Wasserhaushalt ist somit experimentell weitgehend untersucht und gesichert.

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist, die zentrale Wirkung - auf die ADH-Freisetzung - zu untersuchen.

II. ADH

Die Geschichte der Analyse des ADH ist eng verbunden mit der des Oxytocin - eines Hormons, dessen große strukturelle Ähnlichkeit mit dem ADH eine Reindarstellung anfangs erschwerte.

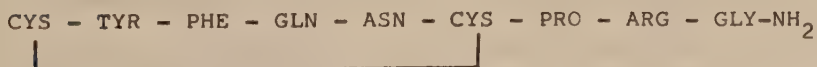
1935 erhielten Stehle und Fraser (19) durch fraktionierte Fällung von Hypophysenextrakten hochgereinigtes ADH, das 1941 von Irving et al. (10) noch weiter gereinigt werden konnte.

Beide Extrakte waren allerdings noch durch Oxytocin unreinigt.

Größere chemische Reinheit des ADH erzielten Potts und Gallagher (19, 20) durch Adsorption des Oxytocin an Zeolite.

Genügend große Homogenität von ADH um Strukturanalysen betreiben zu können, erreichten erst Turner et al. 1951 durch Gegenstromverteilung (21) und Acher und Fromageot 1955 durch Ionophorese (11).

Ebenfalls von Acher et al. (2) wurde die Methode entwickelt, ADH über einen Proteinkomplex (Neurophysin - ADH - Oxytocin) zu isolieren. 5%ige Trichloressigsäure entfernte Neurophysin. ADH und Oxytocin wurden durch Adsorption an Amberlite IRC-50 und Elution mit einem Ammoniumacetatpuffer getrennt. Die hohe Reinheit des durch dieses Verfahren gewonnenen ADH ließ sich durch Chromatographie- und Elektrophoresemethoden beweisen. Die Strukturanalyse mit den für Peptide üblichen Methoden (partielle Säurehydrolyse, Spaltung mit Papain, Sangers DNP-Methode u.a.) ergab folgende Struktur für das ADH:



Molekulargewicht: 1084

Die erste Synthese gelang der Arbeitsgruppe von du Vigneaud im Jahr 1954 (25).

In vivo wird das ADH im Nucleus paraventricularis und

Nucleus supraopticus gebildet. Das in den Ganglienzellen dieser Kerne synthetisierte Hormon wird in langen Neuriten, die den Tractus supraoptico-hypophyseus bilden, zum Hypophysenhinterlappen transportiert, an den Nervenenden gespeichert und durch Nervenimpulse der gleichen Neurone von ihren Bindungsstellen in Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen freigesetzt. Nach Übertritt in die Blutkapillaren des Hinterlappens gelangt das ADH in den Kreislauf.

Der physiologische Angriffspunkt von ADH ist die Niere: distaler Tubulus und Sammelrohr werden für Wasser permeabel. Auf diese Weise steuert das Hormon die renale Wasserrückresorption und dient der Aufrechterhaltung der normalen Osmolalität der Körperflüssigkeiten und des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens.

Die Variabilität dieser beiden Parameter - Osmolalität und Blutvolumen ist es auch, die in erster Linie die Höhe der ADH-Sekretion bestimmt.

In unphysiologisch hohen Dosen führt ADH durch Vasokonstriktion (ADH = "Vasopressin") zu Blutdruckanstiegen. Fernerhin ist eine dem CRF (Corticotropin - Releasing-factor) ähnliche Wirkung auf die ACTH-Sekretion beobachtet.

C. Methodik

I. Analysen

1. Probengewinnung

Venöses Blut (zur Ausführung von Doppelbestimmungen mindestens 15 ml) wurde von "Kontrollpersonen" oder Patienten aus der Vena cubitalis in heparinisierte, eisgekühlte Plastikgefäße entnommen, unmittelbar darauf zentrifugiert (4°C, 2000 rpm, 15 min) und das Plasma in Polyäthylenröhrchen dekantiert. Als "Kontrollpersonen" dienten neun ruhende, gesunde Freiwillige ohne diätetische- oder Flüssigkeitsrestriktion.

Die Plasmaproben wurden bis zur Extraktion bei -20°C aufbewahrt - ein Verlust an ADH während dieser Periode (wenige Tage bis mehrere Wochen) konnte nicht beobachtet werden (siehe Tabelle 1).

2. Extraktion

2.1. Vorversuche

Dem Radioimmunoassay von ADH ist ein Extraktionsverfahren zur möglichst selektiven Anreicherung des Hormones vorgeschaltet. Das Prinzip beruht auf der Adsorption von ADH an Magnesiumtrisilikat (Florisil; Serva

Heidelberg, Korngröße 60 - 100 mesh).

Nach Vorbehandlung (10 x Waschen mit aqua bidest und Trocknen bei + 40°C) ergaben sich dabei im Vergleich zu Spherosil, Corningglas, Silikagel und Bentonite hinsichtlich der Recovery von zugegebenem ADH die besten Ergebnisse.

Adsorption von $^{125}\text{J-ADH}$
% der Gesamtaktivität

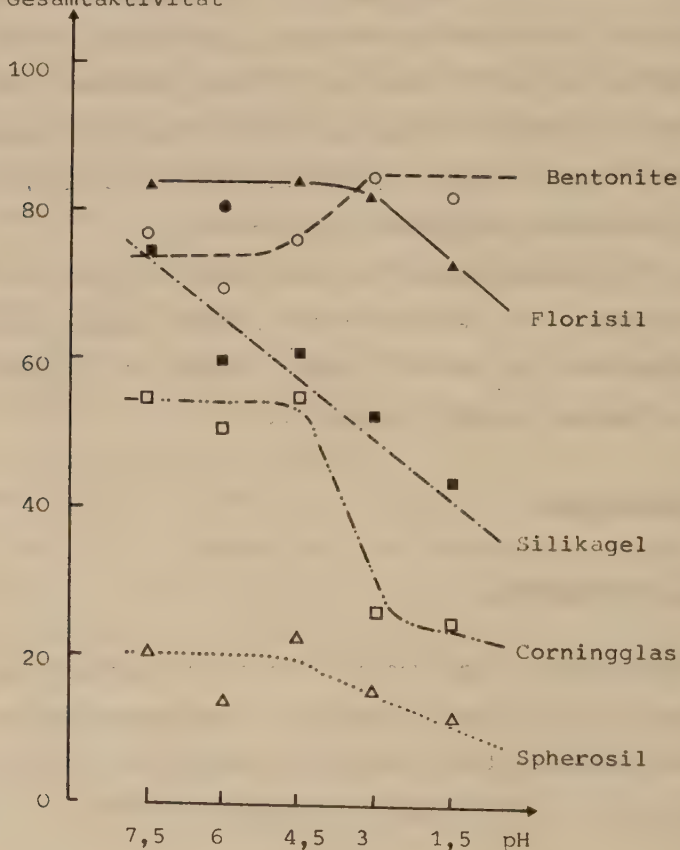


Abb. 1. Adsorption von $^{125}\text{J-ADH}$ an verschiedene Adsorbentien

Aus der Abbildung ist ebenfalls die Abhängigkeit der Adsorptionsfähigkeit vom pH-Wert ersichtlich, das Optimum der Adsorption von ADH liegt danach bei pH = 5,8 - 6,2. Als Elutionsmittel zur Abtrennung des adsorbierten ADH vom Florisil wurden verschiedene Aceton-HCl-Gemische getestet. Ein Volumenverhältnis von 90% Aceton : 10% HCl erwies sich als optimal.

Die Verwendung konzentrierter Essigsäure an Stelle der Salzsäure im Elutionsgemisch führte nicht zu einer weiteren methodischen Verbesserung.

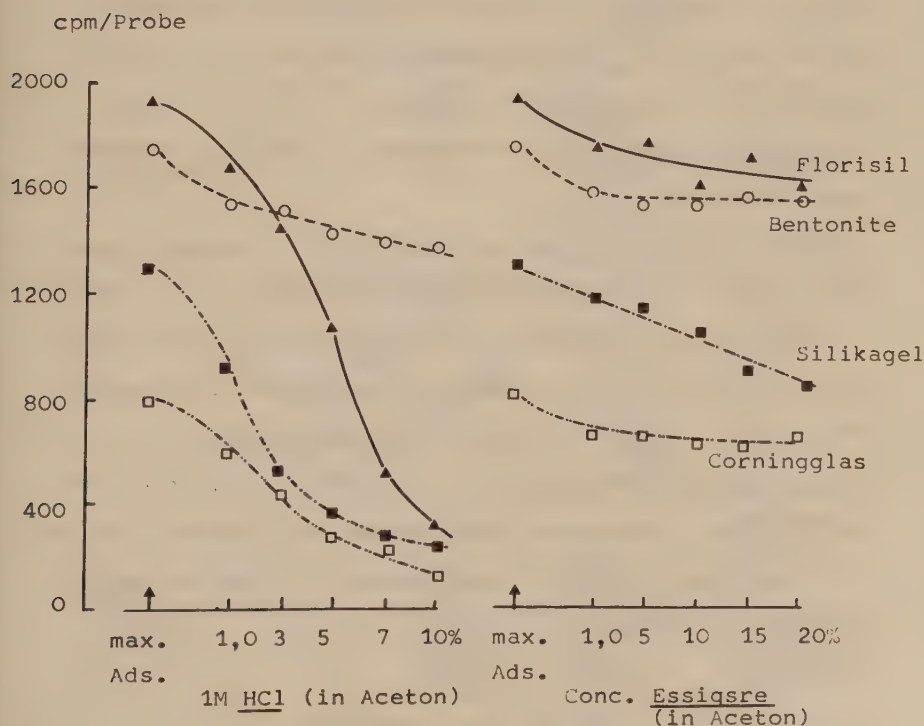


Abb. 2. ^{125}J -ADH gebunden an verschiedene Adsorbentien nach Elutionsversuchen mit unterschiedlichen Lösungen.

Da die verschiedenen Chargen des Florisil eine sehr unterschiedliche Recovery von zugegebenem ADH aufwiesen, mußte jede Charge neu getestet werden. Dazu wurde "Poolplasma" verwendet, dem ADH in steigender Konzentration zugegeben wurde ($c = 4, 8, 16, 32, 64, 128 \text{ pg/ml}$).

Diese Proben, mit zwei "Leerwerten" (= ADH-Gehalt des Poolplasmas) durchliefen normal Extraktion und Assay. Nach Subtraktion des "Leerwertes" von den erhaltenen Konzentrationen ließ sich die prozentuale Wiederfindung berechnen.

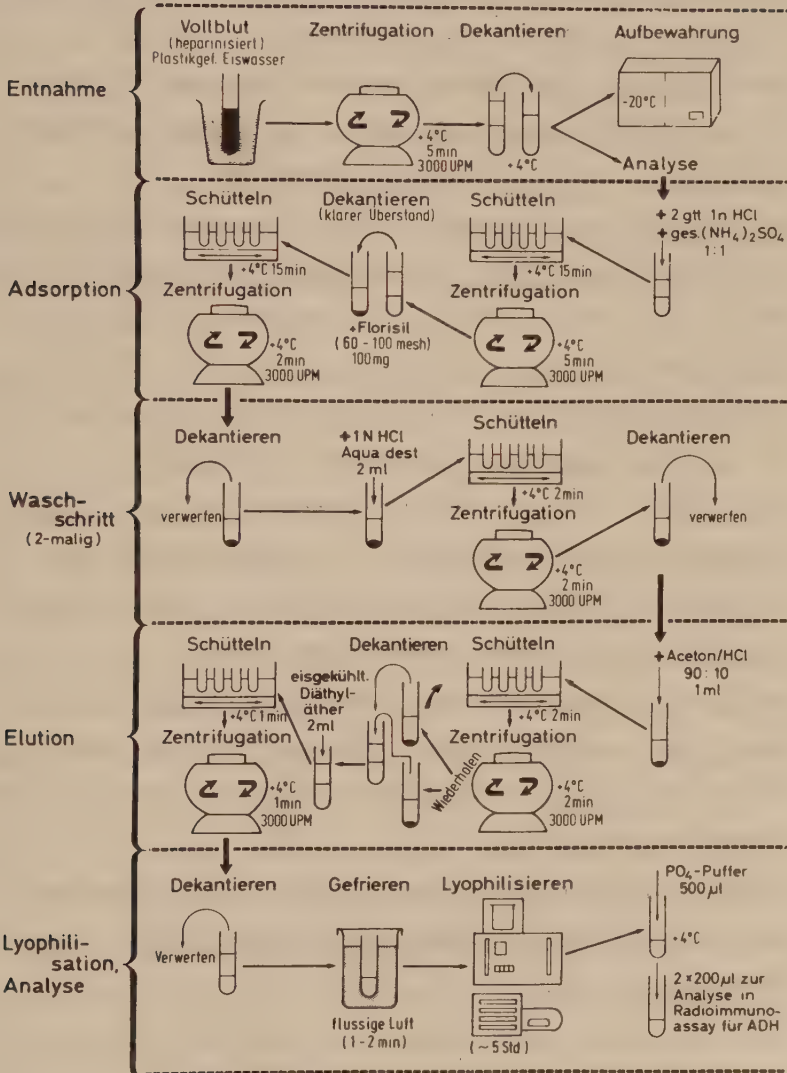
Innerhalb einer Charge blieb die Recovery von zugegebenem ADH konstant. In den hier vorgelegten Versuchsserien betrug die beste Wiederfindungsrate 75%, durchschnittlich etwa $60 \pm 15\%$. Florisilchargen mit einer Wiederfindungsrate von zugegebenem ADH unter 45% wurden nicht verwendet.

Als günstigstes Reagens zur Fällung der Plasmaproteine erwies sich eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung. Andere Fällungsmittel (es wurden Aceton, Alkohol, Uranylacetat und Trichloressigsäure untersucht) erwiesen sich als unbrauchbar: es wurden falsch hohe Werte gemessen.

Zur Vermeidung des vorzeitigen und unkontrollierten ADH-Abbaus durch Freisetzung von Kinasen bzw. anderen aktiven Enzymsystemen wurden bis zur Zugabe von Florisil keine Glasgefäße benutzt.

2.2. Ausführung

SCHEMA DER ADH-EXTRAKTION



Um den für die Extraktion günstigsten pH-Wert ($\text{pH} = 5,8-6,2$) zu erreichen, wurde das Plasma mit 1 Tropfen 25% HCl angesäuert. Die Fällung der Plasmaproteine erfolgte durch Zugabe gleicher Mengen gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu den (3- oder 4 ml) Proben.

Nach Schütteln und Zentrifugation (3000 rpm, 20 min, 4°C) wurde der klare Überstand in Spitzgläschen dekantiert, die je 100 mg Florisil enthielten.

Nach gründlichem Schütteln - 20 min - wurde zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die "Florisilphase" wurde zweimal gewaschen, je einmal mit 1n HCl und aqua bidest.

Anschließend erfolgte die Abtrennung des adsorbierten ADH vom Florisil durch das Aceton-HCl-Gemisch.

Nach Zugabe von 1 ml des Elutionsgemisches zur "Florisilphase" wurden die Proben 20 min geschüttelt, anschließend zentrifugiert, der Überstand sorgfältig abpipettiert und dieser Vorgang wiederholt.

Schließlich wurde das Aceton durch Zugabe von 2 ml Diäthyläther ausgeschüttelt, abgesaugt, die wässrige Phase durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff abgekühlt und sofort lyophilisiert.

Dem Ende der Gefriertrocknung schloß sich - ohne weitere Aufbewahrung der Proben - die radioimmunologische Bestimmung an (s.u.).

3. Radioimmunoassay (RIA)

3.1. Prinzip

Das Prinzip der radioimmunologischen Hormonanalyse liegt in der konkurrierenden Bindung einer bestimmten Menge eines radioaktiv-Markierten Antigens (Tracer) und variierenden Mengen nicht-radioaktiv-markierten Antigens mit dem spezifischen Antikörper. In derartigen Inkubationsgemischen wird umso mehr markiertes Hormon vom Antikörper gebunden, je weniger nicht-markiertes vorhanden ist.

Wird nun die Menge des spezifischen Antikörpers und des Tracers konstant gehalten, läßt sich durch Zugabe bekannter Antigenmengen in steigender Konzentration eine Standardkurve herstellen.

Hat sich am Ende der Reaktion ein Gleichgewicht zwischen: markiertem Antigen, nicht-markiertem Antigen, markiertem Antigen-Antikörperkomplex, nicht-markiertem Antigen-Antikörperkomplex und noch freiem Antikörper gebildet, erfolgt die Trennung von freiem und an den Antikörper gebundenem Tracer. Dies geschieht im vorliegenden Fall nach der Doppelantikörpermethode. Dabei wird mit Hilfe eines 2. Antikörpers (Anti-Rabbit- -Globulin-Antikörper) eine Komplexbildung beider Antikörper erreicht. Durch hochtourige Zentrifugation gelingt es, den aus den gebundenen Anteilen markierten und nicht-markierten

Hormones bestehenden Niederschlag durch Dekantieren von den nicht gebundenen Anteilen des Hormones zu trennen. An der Standardkurve kann die unbekannte Hormonkonzentration in der Probe abgelesen werden.

3.2. Ausführung

3.2.1. Eichkurve

Zur Erstellung der Eichkurve (4-fach Werte) wurden 200µl eines Albumin-Globulin-Puffers (Kaninchen-Normalserum 20%ig + PO_4 -Puffer 1:20) mit 50µl der ADH-Eichlösung in steigender Konzentration (0 - 256 pg/ml) und 50µl des 1. Antikörpers gemischt. Der Antikörper war mit Phosphatpuffer (0,015 M NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl, 0,02% Thiomerosal, 0,2% Pentex, 0,001 M EDTA - eingestellt auf pH = 7,4) auf eine Endkonzentration von 1 : 50 000 verdünnt worden.

Dieses Gemisch wurde bei 4°C 24 Stunden inkubiert.

3.2.2. Plasmaproben

Zur Messung der Plasmaproben wurden die gefriergetrockneten Extrakte (siehe oben) in 700µl des Albumin-Globulin-Puffers gelöst und je drei 200µl Proben als Dreifachwerte in den Assay eingeführt.

Nach Zugabe von 50ul Phosphatpuffer und 50ul des 1. Antikörpers folgte eine 24-stündige Inkubationsperiode bei 4°C.

Nach dieser Präinkubation wurden zu den Proben und zu den Eichlösungen jeweils 50 µl einer ^{125}J -ADH-Lösung (Markierung nach der Chloramin-T-Methode) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden bei 4°C erfolgte die Trennung des gebundenen vom freien Hormon durch Zugabe des "2. Antikörpers" (Doppelantikörpermethode s.o.). Dieser ist ein im Handel (Fa. Wellcome) erhältlichliches Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin-Antiserum vom Esel.

Nach sorgfältigem Durchmischen und erneuter Inkubation bei 4°C für 24 Stunden erfolgte die Trennung durch Zentrifugation der Proben (3000 rpm, 20 min, 4°C). Der Überstand, der das ungebundene Hormon enthielt wurde abgesaugt und verworfen, die Radioaktivität des Präzipitates gemessen.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit Hilfe eines Computers (Siemens 404/3), wobei die Eichkurven durch ein neu entwickeltes Verfahren (Spline approximation) definiert wurden (13).

Abbildung 3 zeigt eine typische Eichkurve.

Die untere Nachweisgrenze für ADH im Plasma bei Anwendung dieser Methode lag bei 0,36 ng/ml.

Um die Genauigkeit der Methode zu überprüfen, wurden bei jeder Analyse "Innere Standards" mitgeführt, das heißt, es wurden jeweils Proben aus einem Plasmapool mit bekannten ADH-Gehalt mitbestimmt.

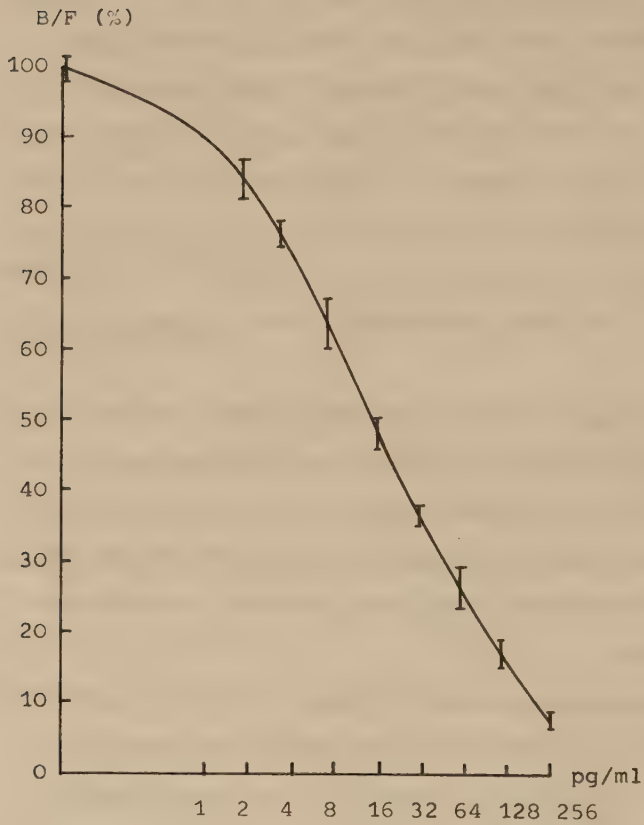


Abb. 3. Typisches Beispiel einer Eichkurve.

II. Tierversuche

1. In vitro Experimente

Die Isolierung von Rattenhypophysen erfolgte nach der Methode von Gagnon (6).

Weibliche Wistarratten (150 - 200g) wurden nach Äthernarkose durch Dekapitation getötet. Die Schädelkalotte wurde eröffnet und das Großhirn vorsichtig abgetragen. Nach Entfernung der Dura mater konnte die Hypophyse aus einer der Sella turcica ähnlichen Vertiefung unbeschädigt entnommen werden.

Die Gesamtdauer der Gewinnung der Hypophyse vom Anästhesiebeginn bis zur Isolation des Organs betrug etwa 3 bis maximal 5 Minuten.

Der experimentelle Aufbau wurde so gewählt, daß (in einem Wärmeblock) acht Inkubationsgefäße gleichzeitig mit jeweils einer Hypophyse beschickt werden konnten. Auf diese Weise wurden gleiche Versuchsbedingungen hinsichtlich der Tageszeit der Entnahme eingehalten.

Die zuerst präparierten Hypophysen wurden bis zum gemeinsamen Versuchsbeginn in kleinen, die Inkubationslösung (4°C) enthaltenden Schalen aufbewahrt.

Je eine Hypophyse wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 1,5 ml einer modifizierten Locke's Lösung (Angaben in mM: NaCl 154, KCl 5,6 CaCl₂ 2,2, MgCl₂ 1,0, NaHCO₃ 6, Glucose 10) bei 37°C unter einer Atmosphäre von 95% O₂

und 5% CO₂ inkubiert.

Der Versuchsablauf war durch die jeweilige Fragestellung bestimmt; einen Überblick gibt folgende Tabelle:

1. Serie A:

"Zeitkontrollserien"

Entnahmen alle 15 min über
eine Periode von 75 min
Entnahmen alle 2 min über
eine Periode von 112 min

2. Serie B:

Zugabe von C_{20:4}

= Arachidonsäure

Nach einer Kontrollperiode
von zweimal 15 min: Zugabe
von C_{20:4}, mit zwei Proben-
entnahmen jeweils in 15 min
Abständen

3. Serie C:

Zugabe von PG E₂

bzw. PG A₂

Nach einer Kontrollperiode
von dreimal 15 min: Zugabe
von PG E₂ bzw. PG A₂. Eine
Probenentnahme nach 15 min

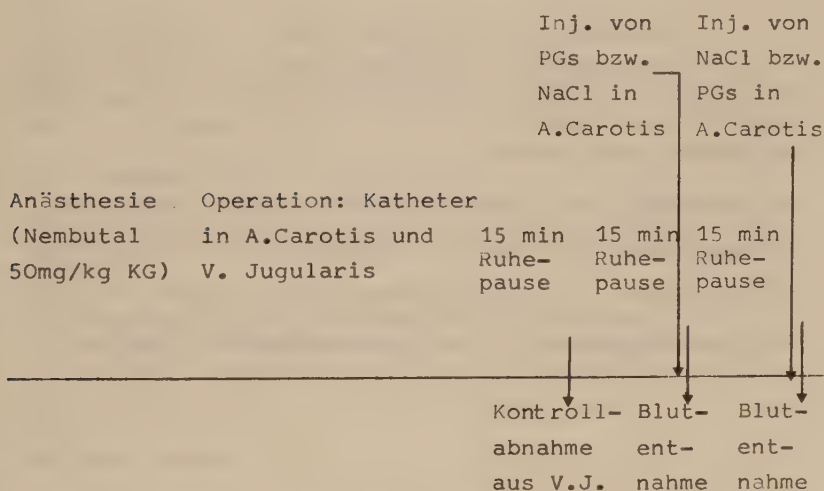
In allen Experimenten wurde jeweils das entnommene Volumen (20ul) durch die gleiche Menge der vorgewärmten Badlösung ersetzt.

Die Proben konnten ohne weitere Zwischenschritte (z.B. Extraktionsverfahren etc.) in den Assay eingebracht werden.

2. In vivo Experimente

Die Versuche wurden an 4 - 6 Monate alten Bastardkaninchen (Gewicht etwa 3 kg) ausgeführt. Die Tiere waren unvorbehandelt und hatten freien Zugang zu Standardnahrung und Wasser.

Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufes zeigt folgendes Schema:



Um ohne einen Effekt auf andere Organsysteme nur im Bereich der Hypophyse eine möglichst hohe Konzentration der zu untersuchenden Substanzen zu erreichen, wurden diese in 15 - 20 min Abständen mit Hilfe einer Kurzin-

fusion von etwa 3 Minuten Dauer in die Carotis infundiert.

Die Prostaglandine (jeweils 50 ug) wurden in 2,5 ml Kochsalzlösung gelöst.

Als Kontrollwert wurde der Plasma-ADH-Wert nach Injektion von 2,5 ml Kochsalz vor bzw. nach der Prostaglandininjektion bestimmt.

Während der operativen Vorbereitungen und der Ruhepausen erhielten die Tiere eine NaCl-Infusion (0,9% - 6 ml/h).

Das für die Analysen benötigte Volumen betrug etwa 6 ml und wurde während der Entnahmen durch das gleiche Volumen Rheomacrodex ersetzt.

Der Hämatokrit der Tiere verminderte sich durch die Probenentnahmen während der Versuche von 31% auf 25%. Die Bestimmung der Plasmaproben erfolgte nach der bereits beschriebenen Extraktionsmethode mit Florisil.

8. Ergebnisse

I. Wiederfindungsrate von ADH aus Plasmaproben

Wurde dem "Poolplasma" ADH in bestimmten Konzentrationen zugegeben (siehe Testung der Florisilchargen) und bestimmt, ergab sich, daß die Wiederfindungsrate von der zugegebenen ADH-Menge unabhängig war. In dem Bereich von 4 - 128 pg/ ml traten Schwankungen von $\pm 3\%$ auf.

Eine Beeinflussung der Recovery von zugegebenem ADH durch verschiedene Plasmavolumina bei gleichbleibender Florisilmenge war nicht nachweisbar. Die zur Analyse verwendeten Volumina schwankten zwischen 1,8 ml (nach Stimulation oder Stress) und 5 ml (Diabetes insipidus).

Im Gegensatz zu den Angaben anderer Gruppen (18), konnte in der Aufbewahrungszeit zwischen Gewinnung und Bestimmung der Proben kein Verlust an ADH-Aktivität nachgewiesen werden.

Tabelle 1 zeigt die Wiederfindungsraten verschiedener Konzentrationen nach unterschiedlicher Aufbewahrungszeit bei -18°C .

Eingesetzte Menge pg/ml	8	16	32
gemessene 1 Wo.	4,8	9,7	19,4
Menge nach 3 Wo.	4,6	9,8	19,2
einer Auf- bewahrungs- zeit von 6 Wo.	4,5	9,6	19,2
12 Wo.	4,7	9,7	19,3

Tab. 1, Wiederfindungsraten verschiedener Konzentrationen an ADH nach unterschiedlicher Aufbewahrungszeit.

II. In vitro Experimente

1. Zeitserien

Die Höhe der spontanen ADH-Abgabe einzelner Hypophysen in das Inkubationsmedium variierte stark. In allen Experimenten war jedoch eine gewisse Periodizität der ADH-Sekretion nachweisbar, wobei alle 5 - 10 Minuten Sekretionsmaxima (sog. "secretory bursts") auftraten.

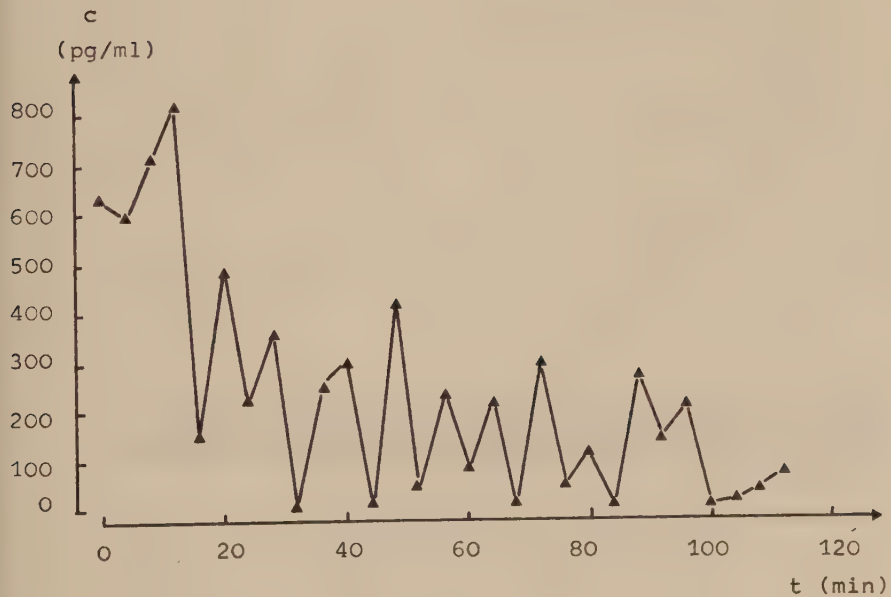


Abb. 4. Spontansekretion einer Hypophyse ins Inkubationsmedium (Probenentnahme alle 4 min über 112 min).

Trotz der beträchtlichen individuellen Streuung der ADH-Abgabe der einzelnen Hypophysen kam es über den betrachteten Zeitraum (bis zu 240 min) zu einer konstant langsam abnehmenden Sekretionsrate von ADH.

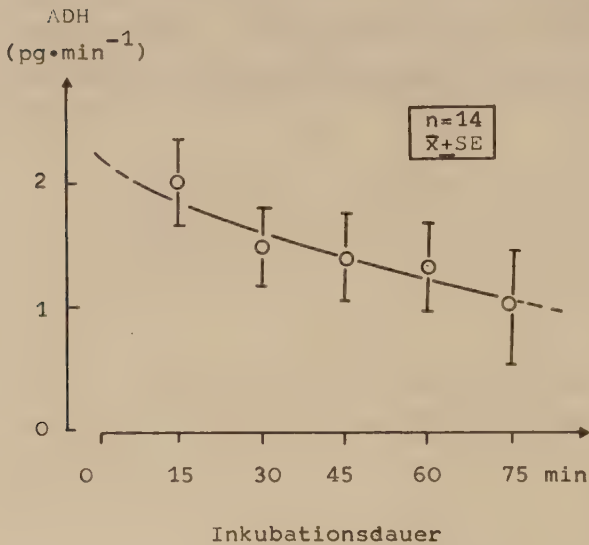


Abb. 5. Mittelwertskurve der Spontansekretion von 14 einzelnen Hypophysen (Probenentnahme alle 15 min über 75 min).

Wurde die Hypophyse dem Inkubationsmedium entnommen, so war bei Probenentnahmen kein ADH nachweisbar.

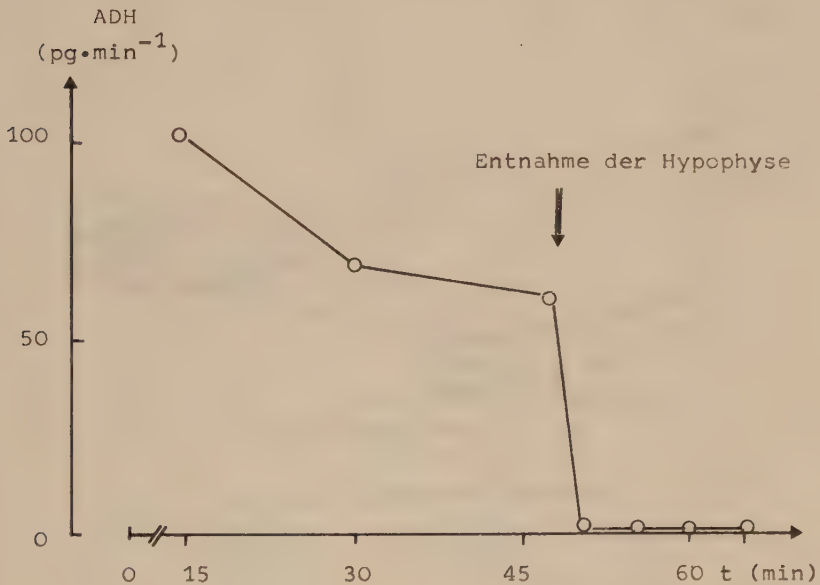


Abb. 6. Konzentrationsabnahme nach Herausnahme der Hypophyse

2. Stimulation der ADH-Sekretion durch PG E₂ bzw. PG A₂

Wurden dem Inkubationsmedium Prostaglandin E₂ oder A₂ zugegeben, zeigte sich ein steiler Anstieg der ADH-Sekretion.

Repräsentative Ergebnisse nach Zugabe von PG A₂ und PG E₂ in Konzentrationen von 5×10^{-6} M zeigt Abb.7.

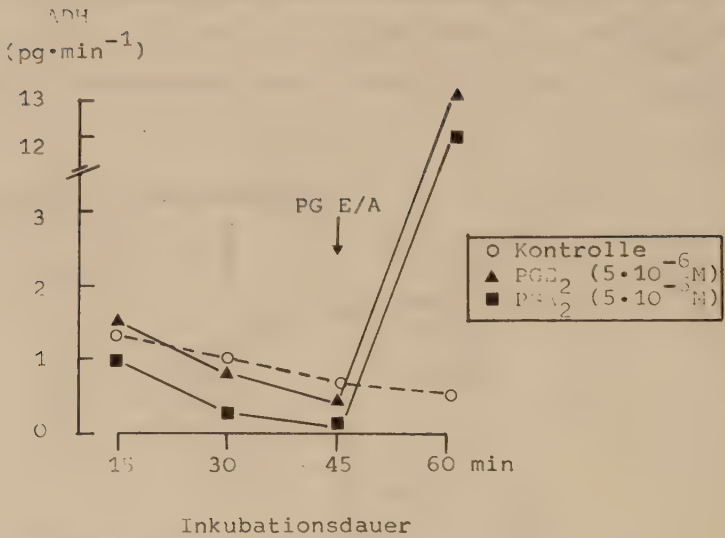


Abb. 7. Zugabe von PG A₂ und PG E₂ ($c = 10^{-6}$ M) zu inkubierten Rattenhypophysen. (Repräsentative Beispiele)

Die Mittelwerte der gesamten Versuche sind in Abbildung 8 dargestellt.

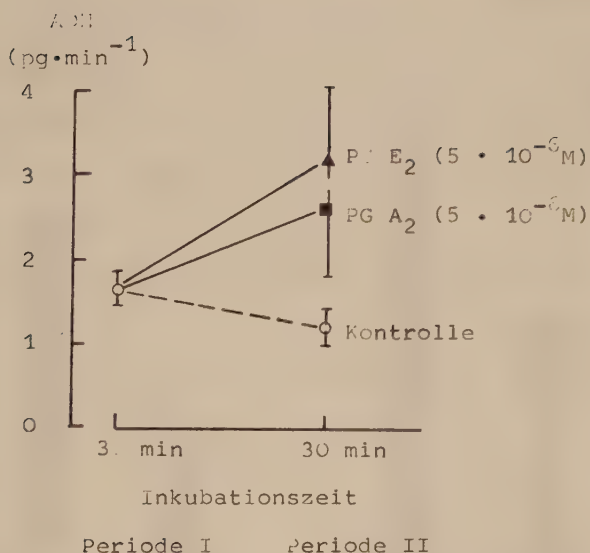


Abb. 8. Mittelwerte der gesamten Versuche einer PG A₂ bzw. PG E₂ stimulierten ADH-Freisetzung aus isolierten Rattenhypophysen.

Resultate mit niedrigeren Konzentrationen - 10⁻⁸ M PG E₂ und 10⁻⁷ M PG A₂ zeigen Abbildung 9 und 10.

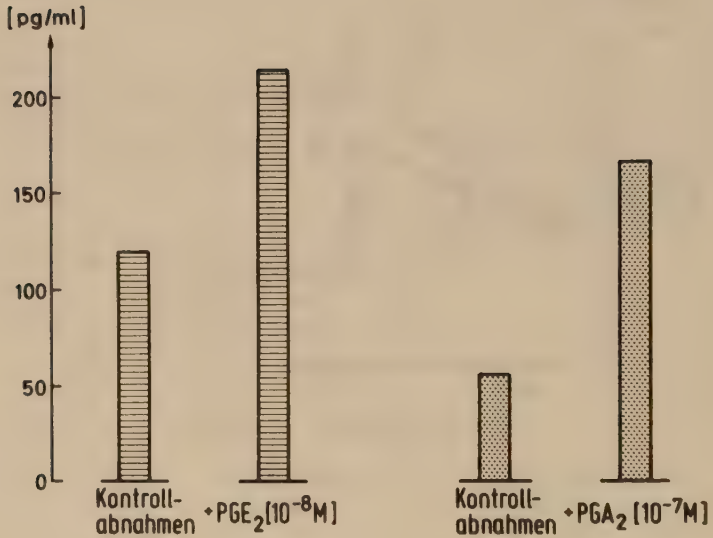


Abb. 9 und Abb. 10. Stimulation der inkubierten Rattenhypophysen durch PG E₂ ($c = 10^{-8}$ M) und PG A₂ ($c = 10^{-7}$ M)

Im Vergleich zur Kontrolle findet sich jeweils ein signifikanter Anstieg der ADH-Freisetzung in die Inkubationslösung.

3. Zugabe von Arachidonsäure C_{20:4}

Um die Frage zu klären, ob es in der Rattenhypophyse ein prostaglandinsynthetisierendes System, ähnlich dem von Ganten et al. (7, 8) für Angiotensin im Hypothalamus beschriebenen gibt, wurde Arachidonsäure als natürliche Vorstufe der Prostaglandine zu den inkubierten Hypophysen gegeben.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse im Vergleich zu Kontrollwerten.

Arachidonsäure wurde in Konzentrationen von 10^{-5} und 10^{-4} M verwendet.

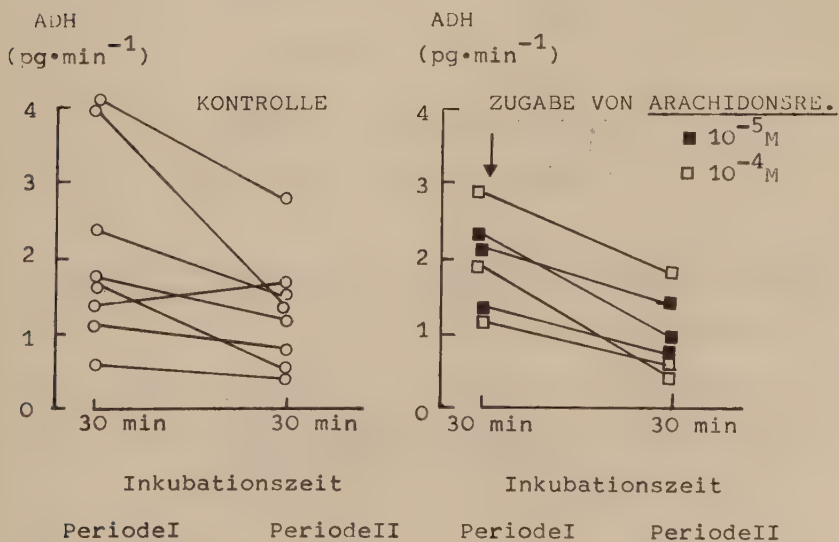


Abb. 11. Ergebnisse nach Zugabe von Arachidonsäure im Vergleich zu Kontrollwerten.

III. In vivo Experimente

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse nach Injektion von PG E₂ und NaCl beim Kaninchen.

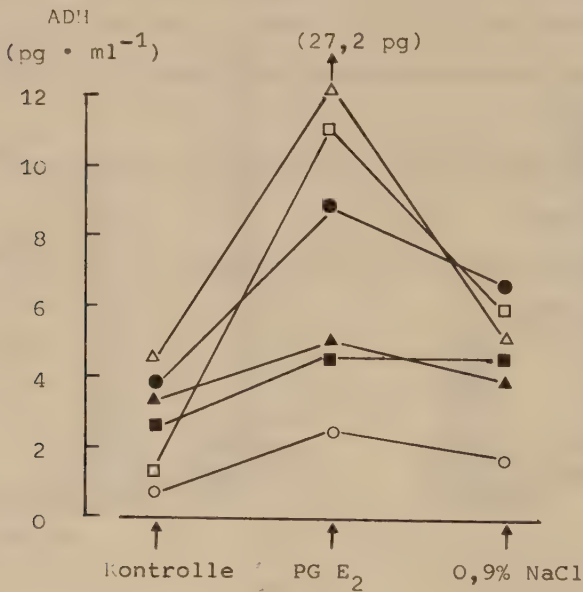


Abb. 12. Injektion von PG E₂ und NaCl in die Carotis von Kaninchen.

Die Mittelwerte der Ergebnisse nach Injektion von NaCl und PG E₂ sind in Abbildung 13 dargestellt.

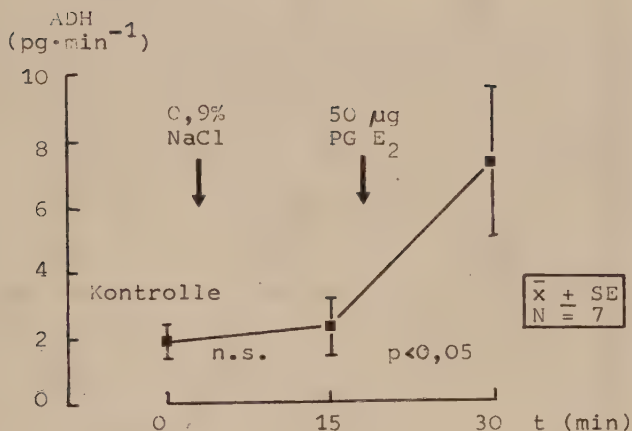


Abb. 13. Mittelwerte (n = 7) nach Injektion von NaCl und PG E₂ in die Carotis von Kaninchen.

Ein weiteres Beispiel ist in Abbildung 14 dargestellt, wobei hier PG A₂, NaCl und PG E₂ appliziert wurden.

Unter Basalbedingungen lagen die Plasma-ADH-Spiegel beim Kaninchen etwa im gleichen Bereich wie beim Menschen (2 - 5 pg/ml). Nach Stimulation durch PG E₂ bzw. PG A₂ lagen die ADH-Werte in allen Fällen signifikant höher. Nach Kontrollinjektionen des Lösungsmittels kam es in allen Fällen wieder zu einer eindeutigen Erniedrigung der Werte.

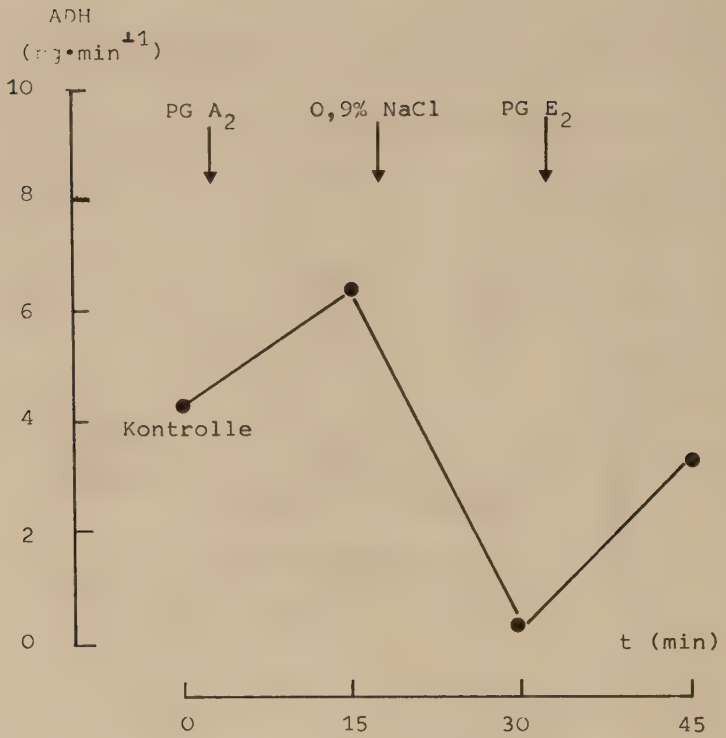


Abb. 14. Injektion von PG A₂, NaCl und PG E₂ in die A. Carotis von Kaninchen.

3. Diskussion

I. Diskussion zur Methode

Der zirkulierende Plasmaspiegel der kleinen Peptidhormone wie ADH, ACTH, Angiotensin II liegt im Bereich weniger Picogramm pro Milliliter. Dieser Bereich entspricht der äußersten Nachweisgrenze der bekannten radioimmunologischen Bestimmungsmethoden.

Um den analytischen Schwierigkeiten zu begegnen bedient man sich zweier wesentlicher Verbesserungen und methodischer Fortentwicklungen:

Die erste besteht in Maßnahmen, die Sensitivität des Assays zu verbessern. Wie gezeigt wurde (5) ist dies nur begrenzt möglich. Die Affinität des zur Verfügung stehenden Antikörpers ist der limitierende Faktor der Sensibilität jedes Immunoassays.

Die zweite Möglichkeit ist das Einschalten eines Extraktionsverfahrens. Hier besteht der Vorteil, daß neben einer Verbesserung der Sensitivität die Möglichkeit der selektiven Anreicherung des gewünschten Hormones gegeben ist.

Da die Sensitivität von der Konzentration des Hormones, nicht aber seiner absoluten Menge abhängt, kann je nach erwarteter Hormonkonzentration von relativ großen Volumina der zu untersuchenden Flüssigkeit ausgegangen werden. Das Volumen des Extraktes ist beträchtlich kleiner.

Im vorliegenden Fall wurden als Ausgangsvolumina 4 ml Plasma verwendet, wobei das Endvolumen (Lyophilisat in Puffer) jeweils nur 0,7 ml betrug.

Grundprinzip der von uns verwendeten Methode ist die Adsorption des Hormones an synthetische Partikel von Florisil (Magnesiumtrisilikat). Dieses Material hat den Vorteil der kontrollierten Zusammensetzung und Porengröße und wirkt sowohl als Molekularsieb als auch als Adsorbens.

Die selektive Adsorption des Peptidhormons ADH ist empirisch durch Austestung einer großen Zahl von Substanzen gefunden worden; der molekulare Mechanismus der Adsorption ist nicht ausreichend bekannt.

Einige Eigenschaften des Adsorbens scheinen jedoch von großer Bedeutung zu sein: z.B. ein hoher Silikatan-
teil und eine Oberflächengröße von mindestens $250 \text{ m}^2/\text{g}$ (Florisil: $300 \text{ m}^2/\text{g}$).

Dies könnte für das Vorliegen von Ionenbindungen (Reaktion der negativen SiO^- mit positiv geladenen Amino-
gruppen) und Oberflächeneffekten sprechen.

Die physikalische und chemische Heterogenität der Oberfläche der meisten Adsorbentien (27) würde die spezifischen Effekte erklären, beispielsweise eine unterschiedlich hohe Adsorption der verschiedenen Peptidhormone.

Optimal für die Adsorption speziell von ADH erwies

sich in unseren Versuchen das Florisil (vgl. Abb. 1).

In Abhängigkeit vom pH-Wert konnten damit Adsorptionsraten von 65 - 85% erzielt werden, wobei sich eine maximale Adsorption über einen relativ großen pH-Bereich erzielen ließ.

Bei den nachfolgenden Waschschritten mit 1 n HCl bzw. aqua bidest traten kleine Verluste an ADH auf - sie lagen bei 4 - 5%.

Als geeignetstes Elutionsmittel erwies sich angesäuertes Aceton (vgl. Abb. 2), wobei die niedrige Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels möglicherweise dafür verantwortlich sein könnte.

Durch Zugabe von Diäthyläther wurden der größte Teil des Acetons und die meisten Plasmalipide entfernt, so daß ein weitgehend protein- und fettfreier Acetonextrakt übrigblieb.

Dieser wurde - um ein zu schnelles Erreichen des Siedepunktes zu vermeiden - durch flüssigen Stickstoff abgekühlt und anschließend lyophilisiert. Dem schloß sich der RIA an.

Das folgende Schema zeigt die mittlere Wiederfindungsrate von 57%, wobei die Verluste von $^{125}\text{J-ADH}$ nach den einzelnen Extraktionsschritten dargestellt sind.

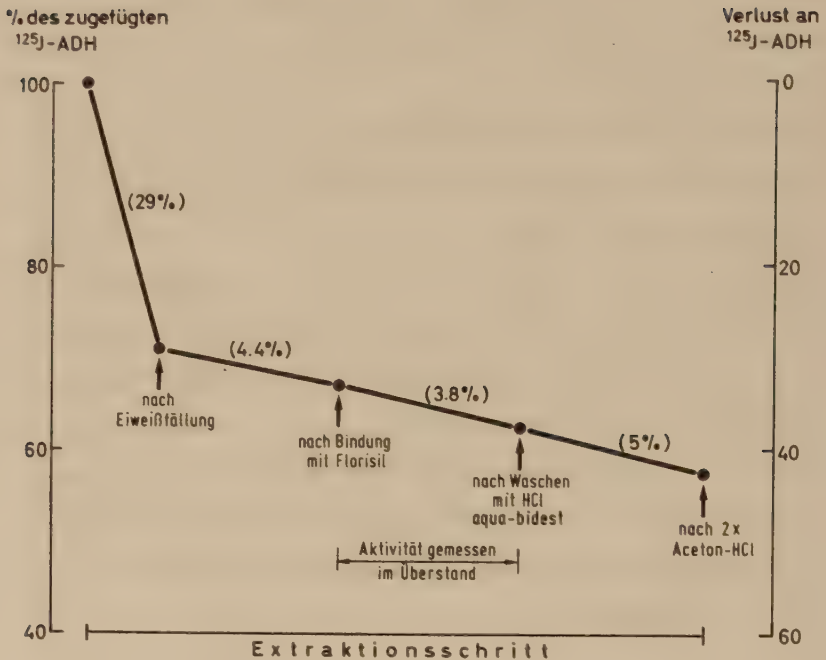


Abb. 15. Verluste an ^{125}J -ADH nach den einzelnen Extraktionsschritten.

Die nach der detailliert beschriebenen Methode bestimmten Konzentrationen an ADH lagen gering über den von Robertson und Beardwell gemessenen. Der Grund hierfür dürfte die an unseren Werten vollzogene Recoverykorrektur sein, auf die obengenannte verzichteten.

Die Plasmakonzentrationen ruhender Normalpersonen lagen zwischen 2,7 und 5,2 pg/ml.

Um die Korrelation zwischen Plasma-ADH-Spiegel und Plasmaosmolalität zu untersuchen, wurden 4 männliche, gesunde freiwillige Probanden für drei Tage unter einer absoluten Flüssigkeitskarenz untersucht. Aus dem Vergleich der Abbildung 16 und 17 geht ein deutliches Ansteigen der ADH-Konzentration mit wachsender Osmolalität hervor.

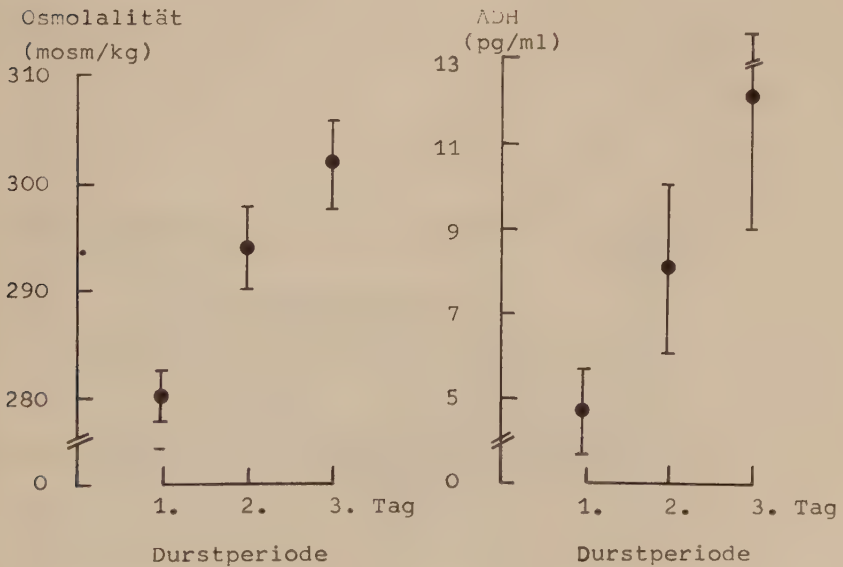


Abb. 16 und 17. Anstieg von Plasmaosmolalität und -ADH-Spiegel während eines dreitägigen "Durstversuches".

Der entgegengesetzte Effekt wurde erwartungsgemäß nach Initiierung einer Diurese (Flüssigkeitsaufnahme: 15 ml/min) gesehen: mit sinkender Osmolalität fiel der ADH-Spiegel.

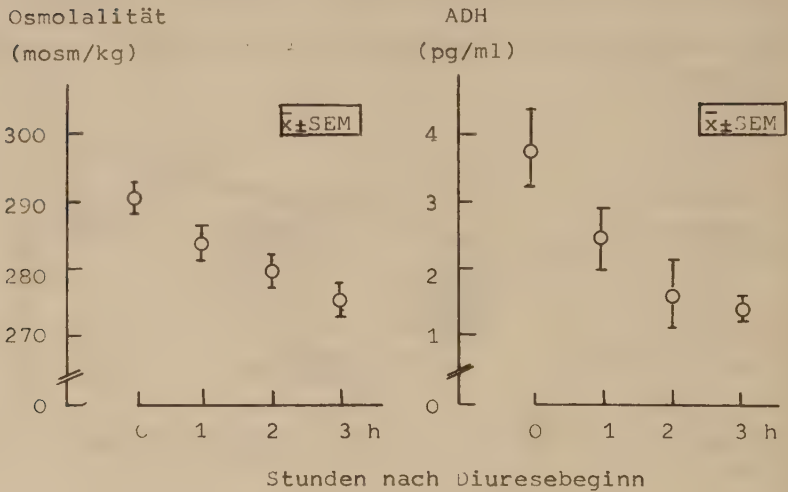


Abb. 18. Absinken von Plasmaosmolalität und -ADH-Spiegel während eines dreitägigen "Diureseversuches".

In Abbildung 19 sind die Einzelwerte von zwei verschiedenen Probanden unter den Bedingungen des vorhin geschilderten dreitägigen Durstversuches aufgetragen. Man sieht, daß der Verlauf deutlich verschieden voneinander ist.

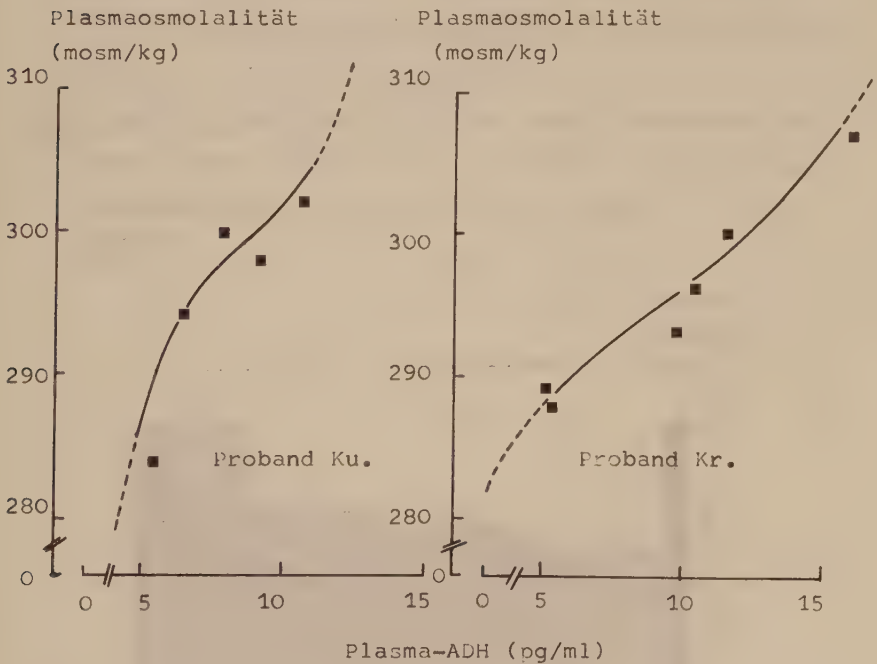


Abb. 19. Korrelation von Plasmaosmolalität und Plasma-ADH zweier Probanden des dreitägigen Durstversuches.

Es besteht Anlaß zu der Annahme, daß Elektrolyte, aber auch Hormone und vielleicht bisher nicht bekannte Faktoren sowohl die Konfiguration der Kurve als auch die Ansprechbarkeit auf osmotische Stimuli beeinflussen

können.

Um die Frage einer Rhythmizität des ADH-Spiegels im Plasma zu untersuchen, wurde bei mehreren Probanden (und Patienten) stündlich über einen Zeitraum von 24 Stunden der ADH-Wert gemessen.

Abbildung 20 zeigt die gepoolten Werte über jeweils 6-Stunden-Perioden. Diese Auftragsweise wurde gewählt um (wenn vorhanden) einen Tag-Nacht bzw. Wach-Schlaf-Rhythmus herauszufinden. Man erkennt, daß während der Schlafperiode ein signifikant höherer ADH-Spiegel zu messen ist als zu den anderen Zeiten.

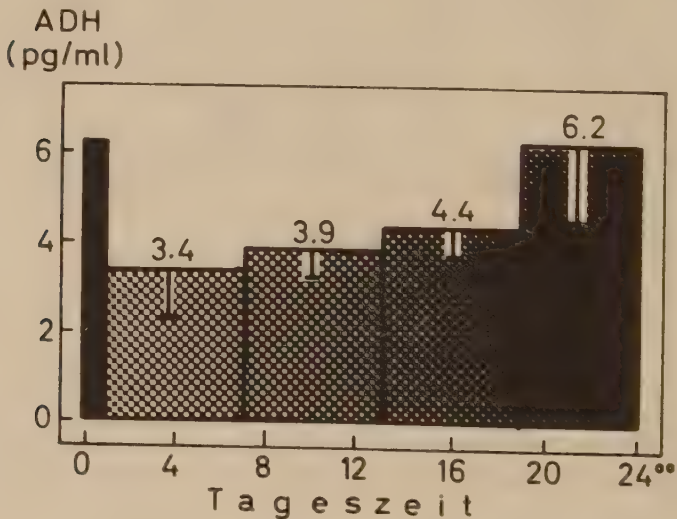


Abb. 20. Über 6-Stunden-Perioden gepoolte Werte eines 24-Stunden-Rhythmus.

Zum Abschluß dieser Betrachtungen zu den unter verschiedenen Bedingungen gemessenen ADH-Werten soll ein Versuch zur Streß-induzierten ADH-Freisetzung vorgestellt werden.

Dazu wurde ein Proband auf einem sich um die Vertikale drehenden Stuhl befestigt und mit sich langsam steigender Winkelbeschleunigung bewegt.

Abbildung 21 zeigt ein typisches Beispiel der dabei gemessenen ADH-Konzentrationen.

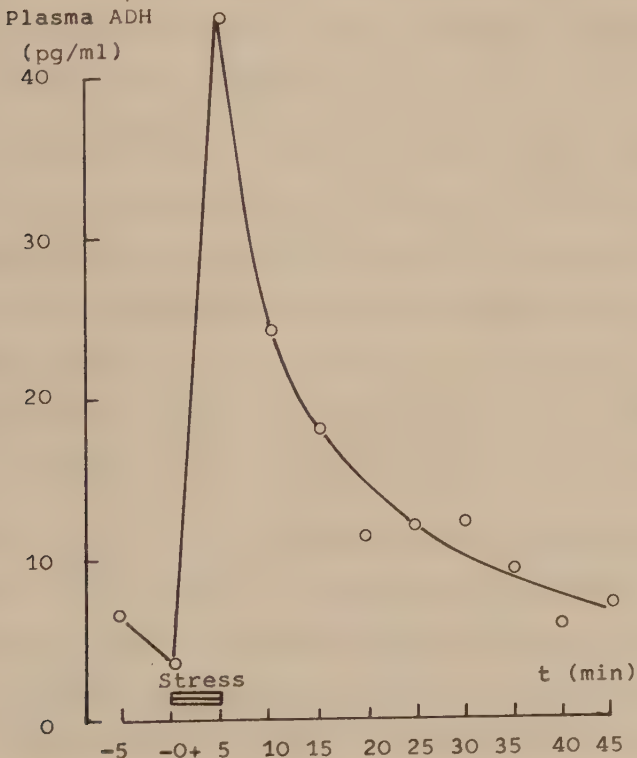


Abb. 21. Stressinduzierte ADH-Freisetzung (Drehstuhlversuch).

Es wurden ADH-Maximalwerte bis zu 86 ng/ml gemessen. Die biologische Wirkung dieses ADH-Exzesses läßt sich auch daran erkennen, daß die Probanden über viele Stunden anurisch waren, im Sinne einer Zwangsanurie.

II. Diskussion der Tierversuche

Kürzlich wurden Ergebnisse veröffentlicht, nach denen die Infusion von Prostaglandin E_2 in die Carotis von wasserbeladenen Ratten zu einem Anstieg der Urinosmolalität und zu einer Verminderung des Urinvolumens führten. Die Autoren vermuteten eine Stimulation der ADH-Freisetzung (26).

Der Arbeitsgruppe um Vilhardt war es nicht möglich, einen signifikanten Anstieg der ADH-Freisetzung aus Rattenneurohypophysen, die mit Prostaglandinen ($c = 3 \times 10^{-8}$ bis 3×10^{-6} M) inkubiert waren, nachzuweisen. Im Gegensatz dazu konnte Gagnon (5) später einen Effekt von PG E_2 auf die ADH-Abgabe aus der Hypophyse nachweisen.

Beide Gruppen haben eine biologische ADH-Bestimmung verwandt. Durch die Entwicklung eines Radioimmunoassays für ADH stand nun eine Methode mit gesteigerter Empfindlichkeit für die ADH-Messung zur Verfügung. Für orientierende Versuche zur PG-stimulierten ADH-

Abgabe wurde das Modell der isolierten Rattenhypophyse benutzt, das durch in vivo Versuche an Kaninchen ergänzt wurde.

In allen in vitro und in vivo Versuchen war ein signifikanter Anstieg der spontanen ADH-Freisetzung nach Applikation von PG E₂ bzw. PG A₂ nachweisbar.

Die Ursache der Diskrepanz zu den Ergebnissen Vilhardts der keinen Effekt sah, könnte darin begründet sein, daß PG E₂ in den meisten seiner Versuche zu einem Inkubationsmedium gegeben wurde, das Natrium in einer Konzentration von $5,6 \times 10^{-2}$ M enthielt, was allein bereits die Freisetzung von ADH deutlich stimuliert.

Die Zugabe des Prostaglandin-Precursors Arachidonsäure in zwei verschiedenen Konzentrationen (wobei beide sicher Substratsättigung darstellen) führte zu keiner Änderung der ADH-Sekretion.

Folgende Mechanismen könnten diesem Befund zugrundeliegen:

1. Die Substanz Prostaglandin selbst hat eine Bedeutung in der Modifikation der ADH-Freisetzung.
2. Eine Prostaglandinsynthetase liegt nicht oder aber nicht in solch hoher Konzentration vor, daß sie bei ausreichendem Angebot von Precursor große Mengen Prostaglandine bildet, zumindest nicht in solchen Mengen, daß sie indirekt über eine stimulierbare Prostaglandinsynthese und eine nachfolgend gesteigerte ADH-Ab-

gabe aus isoliertem Hypophysengewebe meßbar wäre.

Die Ergebnisse nochmals zusammengefaßt:

1. Prostaglandine A_2 und E_2 führten zu einer signifikanten Erhöhung der ADH-Freisetzung aus isolierten Hypophysen
2. Durch Zugabe des Prostaglandin-Precursors Arachidonsäure ließ sich dieser Effekt nicht reproduzieren, daher scheint die Annahme berechtigt, daß nur Prostaglandine als Substanz die genannte Wirkung entfalten.
3. Durch intraarterielle Gabe von Prostaglandin E_2 in die Carotis beim Kaninchen ist ein Anstieg des systemischen ADH nachweisbar.

Diese Befunde scheinen physiologisch und pathophysiologisch von Bedeutung zu sein:

Zum ersten setzt sich hier die Reihe der Befunde fort, die eine Releasing-Funktion verschiedener Prostaglandine nachgewiesen haben. Was u.a. Sato für Prolactin und FSH nach PG E_1 und 2, Johnson für Insulin, andere für Wachstumshormon und für intestinale Hormone nachgewiesen haben scheint sich auch für ADH zu bestätigen. Von Bedeutung ist schließlich der dem Angiotensin-System vergleichbare Befund: wie für dieses wäre auch für die Prostaglandine, zumindest für das PG E_2 ein "intrinsic system" im Hypothalamus-Hypophysenbereich vorstellbar.

Sollte PG E_2 für die ADH-Freisetzung von Bedeutung sein, muß dieser Vorgang auf lokaler Ebene stattfinden, und es wäre eine lokale Synthetase anzunehmen, da PG E_2 im Gegensatz zu PG A_2 bei einer Passage durch die Lungen nahezu vollständig metabolisiert wird.

Aus den vorliegenden Daten geht hervor, daß sich die einzelnen Schritte der ADH-gesteuerten Flüssigkeitsbilanzierung noch nicht völlig eindeutig definieren lassen. Es scheint sich jedoch zunehmend deutlich abzuzeichnen, daß die sensibel reagierende zentrale Regulation des Salz-Wasser-Haushaltes durch viele, nicht zuletzt auch hormonvermittelte Einflüsse variiert wird.

F. Zusammenfassung

Die Freisetzung von Antidiuretischem Hormon (ADH) aus der Hypophyse wird durch eine Vielzahl von Einflüssen variiert. Die wichtigsten sind Plasmahypertonizität und -hypervolämie. In jüngster Zeit mehren sich Befunde zur Bedeutung von Hormonen als zusätzliche modifizierende Faktoren.

Daher wurde der Einfluß von Prostaglandinen, von denen bereits ein peripherer Einfluß auf den Salz- und Wasserhaushalt bekannt ist, auf die ADH-Freisetzung aus der Hypophyse untersucht.

Die Experimente schließen in vitro Versuche an der isolierten Rattenhypophyse und in vivo Studien an Kaninchen ein.

Zunächst wurden die ADH-Werte unter basalen experimentellen Bedingungen gemessen. Die anschließende Applikation von PG E₂ und PG A₂ in die Inkubationslösung isolierter Hypophysen bzw. in die Carotis von Kaninchen führte zu einer Erhöhung der ADH-Abgabe.

Gabe des Prostaglandin-Precursors Arachidonsäure führte zu keiner Änderung der Sekretionsrate gegenüber den Basalwerten.

Das bisher bei Experimenten dieser Art bestehende Problem der Unempfindlichkeit biologischer ADH-Bestimmungsmethoden wurde durch die Entwicklung eines radioimmuno-

logischen Verfahrens überwunden. Wesentliche Verbesserung von Spezifität und Sensibilität konnte dabei durch die Einschaltung eines Extraktionsverfahrens erzielt werden. Das als Adsorbens verwendete "Florisil" zeigte bei Vergleich mit anderen Peptidhormonen nahezu selektive Affinität zu ADH.

Das nach den verschiedenen Extraktionsschritten (Adsorption des ADH an Florisil, Waschen der "Florisil-phase", Elution des ADH, Gefriertrocknung) erhaltene Lyophilisat wurde nach Lösen in Puffer in den RIA (Ausführung nach der "Doppelantikörpermethode") eingebracht. Infolge der bei dem Assay notwendigen Inkubationszeiten betrug die Dauer eines Analysenganges 5 Tage.

Die untere Nachweisgrenze für ADH im Plasma bei Anwendung der Methode betrug 0,36 pg/ml.

Im Zusammenhang mit der Beschreibung der Methode wurde in der vorliegenden Arbeit auf einige der am Menschen unter verschiedenen Bedingungen gemessenen ADH-Werte näher eingegangen.

G. Literaturverzeichnis

1. A C H E R, R. et Cl. Fromageot: Chimie des hormones neurohypophysaires.
Ergebn. Physiol. 48, 286 (1955).
2. A C H E R, R., A. Light, and V. du Vigneaud:
Purification of oxytocin and vasopressin by way of a protein complex.
J. biol. Chem. 233, 116 (1958b).
3. A N D E R S S O N, B., and L.G. Leksell: Effects on fluid balance of intraventricular infusion of prostaglandin E₁.
Acta Physiol. Scand., in press.
4. B O N J O U R, J.P., and R.L. Malvin: Plasma conc. of ADH in conscious and anesthetized dogs.
Amer. J. Physiol. 218, 1128 (1970).
5. C H A R D, T., M.L. Forsling, M.A.R. James, M.I. Kitau, and J. Landon: The development of a radio-immunoassay for oxytocin: sensitivity of the assay in aqueous buffer solution, specificity and the dissociation of immunological and biological activity.
J. Endocr. 46, 533 (1970b).
6. G A G N O N, D.J., D. Cousineau, and P.J. Boucher: Release of vasopressin by angiotensin II and prostaglandin E₂ from the rat neuro-hypophysis in vitro.
Life Sciences 12, 487 (1973).

7. G A N T E N, D., A. Marquez-Julio, P. Granger,
K. Hayduk, K.P. Karsunky, R. Boucher, and J. Genest:
Renin in dog brain.
Amer. J. Physiol. 221, 1733 (1971).
8. G A N T E N, D., M. Kusumoto , G. Constantopoulos,
U. Ganten, R. Boucher, and J. Genest: Iso-Renin,
electrolytes and catecholamines in the dog brain:
possible interrelationship.
Live Sciences 12, 1 (1973).
9. G R A N T H A M, J.J., and Orloff J. : Effect of
prostaglandin E_1 on the permeability response of the
isolates collecting tubule to vasopressin, adenosine
3', 5'- monophosphate and theophylline.
J. Clin. Invest. 47, 1154 (1968).
10. I R V I N G , G.W., M.M. Dyer, and V. du Vigneaud:
Purification of the pressor principle of the posterior
lobe of pituitary gland by electrophoresis.
J. Amer.chem. Soc. 63, 503 (1941).
11. J O H N S T O N, H.H., J.P. Herzog, and D.P. Lauler:
Effect of prostaglandin E_1 on renal hemodynamics,
sodium and water excretion.
Amer. J. Physiol. 213, 939 (1967).
12. L E E, J.B.: Cardiovasc. implications of the renal
prostaglandins in "Prostaglandin Symposium of the
Worcester Foundation for Experimental Biology".
P.W. Ramwell and J.E. Shaw (eds.) p. 131, Inter-
science Publishers, New York (1968).

13. M A R S C H N E R, I., H. Dobry, F. Erhardt, T. Landersdorfer, B. Popp, C. Ringel, und P.C. Scriba: Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels Spline-Funktionen. *Ärztl. Lab.* 20, 184 (1974).
14. M O U W, D., J.-P. Bonjour, R.L. Malvin, and A. Vander: Central action of angiotensin in stimulating ADH release. *Am. J. Physiol.* 220, 239 (1971).
15. O R L O F F, J., J.S. Handler and S. Bergström: Effects of prostaglandin (PG E₁) on the permeability response of toad bladder to vasopressin, theophylline and adenosine 3', 5'-monophosphate. *Nature* 205, 397 (1965).
16. P O T T S, A.M., and T.F. Gallagher: Cystine, tyrosine and arginine content of high potency pressor and oxytocic pituitary hormones. *J. biol. Chem.* 143, 561 (1942).
17. P O T T S, A.M., and T.F. Gallagher: Separation of oxytocic and pressor principles of posterior pituitary extracts. *J. biol. Chem.* 154, 349 (1944).
18. R O B E R T S O N, G.L., Mahr, E.A., S. Athar, T. Sinha: Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma. *J. Clin. Invest.* 52, 2340 (1973).

19. S T E H L E, R.L., and A.M. Praser: The purification of pressor and oxytocic hormones of the pituitary gland and some observations on the chemistry of the products.
J. Pharmacol. exp. Ther. 55, 136 (1935).
20. S W A N S O N, L.W., and L.G. Sharpe: Centrally induced drinking; comparison of angiotensin II- and carbachol- sensitive sites in rats.
Amer. J. Physiol. 225, 566 (1973).
21. T U R N E R, R.A., J.G. Pierce, and V. du Vigneaud: The purification and the amino acid content of vasopressin preparations.
J. biol. Chem. 191, 21 (1951).
22. U H L I C H, E., P. Weber, and U. Gröschel-Stewart: Angiotensin-stimulated vasopressin release in man, radioimmunologically determined plasma levels of vasopressin.
Acta endocr. (Kbh.) 184, 52 (1974).
23. U H L I C H, E., R. Haslbeck, and P. Weber: Prostaglandin stimulated vasopressin release from isolated rat neurohypophysis.
Acta endocr. (Kbh.) 193, 131 (1975).
24. V A N D E R, A.J.: Direct effects of prostaglandin on renal function and renin release in anaesthetized dog.
Amer. J. Physiol. 214, 218 (1968).

25. V I G N E A U D, V. du, D.T. Gish, and P.G. Katsoyannis: A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vasopressin. J. Amer. Chem. Soc. 76, 4751 (1954b).
26. V I L H A R D T, M., and P. Hedqvist: A possible role of prostaglandin E₂ in the regulation of vasopressin secretion in rats. Live Sciences 9, 825 (1970).
27. W O L F, F.J.: In Separation Methods in Organic Chemistry. Akademic Press New York 183 (1969).
28. Y A N G, H.-Y., and N.H. Neff: Differential distribution of angiotensin converting enzyme in the anterior and posterior lobe of the rat pituitary. J. Neurochemistry 21, 1035 (1973).

Herrn Prof. Dr. E. Buchborn, Direktor der II. Medizinischen Klinik München, danke ich, daß ich den experimentellen Teil meiner Arbeit an seiner Klinik durchführen durfte.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. E. Uhlich für die Stellung des Themas, sowie für seine hilfreiche Unterstützung und wertvolle Kritik aussprechen.

Herrn Dr. P. Weber danke ich für seine konstruktiven Anregungen.

Zum Schluß möchte ich es nicht versäumen, auch Frl. Ebner, Frl. Herbst und Frl. Zatzkowski für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente zu danken, ferner Frau Nirschl.

Lebenslauf

14. Juni 1952	geboren in Mellersdorf Vater: Rudolf Haslbeck, Kreisbaumeister Mutter: Rosemarie Haslbeck, geb. Steininger
1958	Volksschule Vilshofen
1963	Math.-Naturwiss. Gymnasium Vilshofen
1971	Abitur
1971	Beginn des Studiums der Chemie und Biologie
1972	Beginn des medizinischen Studiums an der Ludwig Maximilians-Universität zu München
1973	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
1974	Ärztliche Vorprüfung
1975	1. medizinisches Staatsexamen
1977	2. medizinisches Staatsexamen
1977	Internatsjahr im Städt. Krankenhaus Landshut (Innere), in der Urologischen und chirurgischen Universitätsklinik München und der 1. Universitäts- Frauenklinik München
1978	3. medizinisches Staatsexamen

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

